



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 9/16		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/55309 (43) Date de publication internationale: 4 novembre 1999 (04.11.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01005		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 28 avril 1999 (28.04.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/05424 29 avril 1998 (29.04.98) FR			
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): VIRSOL [FR/FR]; 46, rue Boissière, F-75116 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BRU-MAGNIEZ, Nicole [FR/FR]; 24-26, avenue Raphaël, F-75016 Paris (FR). LE VISAGE, Catherine [FR/FR]; 35, rue de la Butte aux Cailles, F-75013 Paris (FR). FATTAL, Elias [FR/FR]; 224, rue du Faubourg St. Antoine, F-75012 Paris (FR). COUVREUR, Patrick [BE/FR]; 1 bis, rue du Lac Léman, F-91140 Villebon sur Yvette (FR). BRETON, Pascal [FR/FR]; La Taille Haute, RD 13, F-45510 Tigy (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(74) Mandataires: HUBERT, Philippe etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).			
(54) Title: NOVEL POLY(METHYLDENE MALONATE) MICROSPHERES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM			
(54) Titre: NOUVELLES MICROSPHERES A BASE DE POLY(METHYLDENE MALONATE), LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT			
$ \begin{array}{c} \text{COOR}_1 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{C}- \\ \\ \text{COO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOR}_2 \end{array} \quad (I) $			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns novel microspheres particularly useful in pharmaceutics as particulate vectors for carrying biologically active substances, in particular hydrophilic substances, for oral administration. The invention is characterised in that said microspheres consist of a support material continuous lattice wherein is optionally dispersed a substance, said support material containing at least 70 wt.% of a homopolymer consisting of recurrent units corresponding to general formula (I) wherein: R₁ represents an alkyl group containing 1 to 6 carbon atoms or a (CH₂)_m - COOR₃ group wherein m is an integer ranging between 1 and 5 and R₃ represents an alkyl group having 1 to 6 carbon atoms; R₂ represents an alkyl group having 1 to 6 carbon atoms; and n is an integer ranging between 1 and 5. The invention is useful in pharmaceutics.</p>			

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet de nouvelles microsphères notamment utiles dans le domaine pharmaceutique comme vecteurs particulaires destinés au transport de substances biologiquement actives, en particulier de substances hydrophiles, en vue d'une administration orale. Selon l'invention, ces microsphères sont constituées d'un réseau continu d'un matériau support dans lequel est éventuellement dispersée une substance, ledit matériau support contenant au moins 70 % en poids d'un homopolymère constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I), dans laquelle; R₁ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ou un groupe (CH₂)_m - COOR₃ dans lequel m est un nombre entier compris entre 1 et 5 et R₃ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone; R₂ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone; et n est un nombre entier compris entre 1 et 5. Application: domaine pharmaceutique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizstan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

Nouvelles microsphères à base de poly(méthylidène malonate), leur procédé de préparation et compositions pharmaceutiques les contenant.

La présente invention a pour objet de nouvelles microsphères notamment utiles dans le domaine pharmaceutique comme vecteurs particulaires destinés au 5 transport de substances biologiquement actives, en particulier de substances hydrophiles (peptides ou protéines), en vue d'une administration orale.

L'invention a également pour objet un procédé de fabrication de ces microsphères et des compositions pharmaceutiques les contenant.

Dans le cadre de la présente description, on entend désigner par le terme 10 "microsphères" des particules sensiblement sphériques, d'un diamètre moyen compris entre 1 µm et 100 µm, et de préférence entre 5 et 100 µm formées d'un réseau continu, plus ou moins dense, d'un matériau support.

Ces microsphères se différencient des microcapsules qui sont constituées 15 d'une paroi entourant une cavité. Il est cependant à noter que les microsphères préparées en émulsion multiple peuvent comporter un ensemble de globules dispersés dans le réseau continu les constituant.

Dans ce dernier cas, le volume total de ces globules représentera généralement une fraction comprise entre 1 : 20 et 1 : 2 du volume total des microsphères.

20 Au cours des dernières années, de nombreuses études ont permis de montrer que des systèmes particulaires à base de polymères peuvent être utilisés pour modifier le profil de libération d'une substance thérapeutiquement active.

C'est ainsi que des microsphères à base de polymères synthétiques, comme par exemple, de poly(acide lactique), de poly(acide lactique-co-glycolique), de polystyrène, de polyepsilonecaprolactone, de polyméthylméthacrylate, ou encore à base de méthylcellulose ou d'éthylcellulose 25 ont été préparées, par des techniques variées.

Cependant, les microsphères ainsi obtenues sont généralement non biodégradables, et lorsqu'elles le sont, elles se caractérisent par une dégradation 30 très retardée dans le temps.

Ainsi, dans le cas des microsphères à base d'acide poly(lactique), par exemple, la dégradation n'est pas progressive et se produit en une seule fois après un intervalle de temps important.

En outre, les polymères lactiques se dégradent en libérant des produits 35 fortement acides qui, non seulement entraînent l'autocatalyse de la dégradation du

polymère, mais sont à l'origine de l'induction d'incompatibilités avec les substances encapsulées.

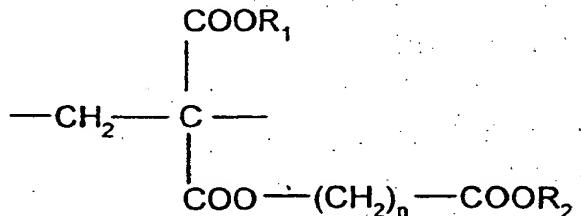
Dans le cas des autres polymères utilisés, les microsphères présentent une vitesse de dégradation extrêmement faible, voire nulle.

5 Le temps de rémanence dans l'organisme de telles particules peut en limiter l'application répétée chez l'homme.

Enfin, les microsphères connues se caractérisent, pour la plupart, par une hydrophobicité importante qui favorise des interactions fortes et souvent dénaturantes avec la substance à encapsuler, en particulier lorsque cette dernière
10 est de nature protéïnique ou peptidique.

Il a été découvert, et ceci constitue le fondement de la présente invention, qu'il était possible de réaliser de nouvelles microsphères qui permettent de remédier aux inconvénients des microsphères de l'état de la technique.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente demande a pour objet des
15 microsphères constituées d'un réseau continu d'un matériau support dans lequel est éventuellement dispersée une substance, caractérisées en ce que ledit matériau support contient au moins 70 % en poids d'un homopolymère constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I) suivante :



20

dans laquelle :

- R₁ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ou un groupe (CH₂)_m-COOR₃, dans lequel m est un nombre entier compris entre 1 et 5 et R₃ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ;

- R₂ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et
- n est un nombre entier compris entre 1 et 5.

Il a été montré qu'en raison de la nature chimique des polymères formant
30 leur matrice, ces nouvelles microsphères :

- présentent une cinétique de dégradation progressive et modulée ;

- permettent d'encapsuler avec une grande efficacité des substances hydrophiles, notamment d'origine biologique ;

Il a en outre été observé, d'une façon tout à fait surprenante et inattendue, que ces microsphères :

5 - peuvent induire une stimulation de la réponse immunitaire, lorsqu'elles sont associées à un antigène ;
- permettent, dans certains cas, la suppression de réactions pathologiques d'hypersensibilité (induction d'une tolérance), lorsqu'elles sont administrées par voie orale.

10 C'est donc la nature du matériau polymérique formant la matrice des microsphères qui constitue l'originalité de la présente invention.

Ce matériau polymérique est essentiellement formé d'un homopolymère constitué d'unités récurrentes de formule générale (I).

15 De tels polymères présentent la propriété remarquable d'être biocompatibles et bioérodables, c'est à dire qu'ils sont susceptibles de se dégrader par voie chimique ou biochimique, par coupure des substituants latéraux.

La vitesse d'érosion des microsphères conformes à l'invention étant dépendante du poids moléculaire du matériau support, elle peut donc être modulée simplement, en utilisant un matériau support ayant un poids moléculaire adapté à 20 la vitesse d'érosion désirée.

Les microsphères selon la présente invention présentent donc une bioérosion modulée et progressive permettant, par exemple, le transport d'une substance biologiquement active, dispersée dans le matériau support, jusqu'à l'endroit de l'organisme où son action sera la plus efficace.

25 La bioérosion des microsphères évite également leur accumulation dans l'organisme ; leur utilisation n'est donc plus limitée.

Selon une caractéristique particulière, l'homopolymère précité est constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I) dans laquelle :

30 R, représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ;
R₂, représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et
n est un nombre égal à 1 ;

et de préférence dans laquelle R₁ et R₂ représentent un groupement CH₂-CH₃.

Ces différents types de polymères de la famille des poly(méthylidène-malonate) conviennent particulièrement à l'encapsulation de substances

hydrophiles, notamment d'origine biologique, et éventuellement biologiquement actives.

Par "molécule biologiquement active", on entend de manière non limitative toute molécule ayant une activité biologique prophylactique ou curative, 5 in vitro ou in vivo, notamment un agent anti-infectieux, en particulier un agent antiseptique, antibiotique, antiviral, antiparasitaire ou antimitotique, notamment anticancéreux.

Des agents antibiotiques ou antiseptiques utilisables peuvent être par exemple la rifampicine et la colistine.

10 A titre d'exemples d'agents antiviraux, on peut citer de manière non limitative la didanosine, la ribavirine, la zidovudine, l'acyclovir, le ganciclovir, le foscarnet, la vidarabine et la zalcitabine.

Le cis-plastine et le taxol peuvent par exemple être utilisés en tant qu'agents anticancéreux.

15 Selon un mode de réalisation actuellement préféré de l'invention, le matériau support des microsphères contient :

- de 90 % à 99,5 % en poids d'un homopolymère tel que défini précédemment ; et

20 - de 0,5 % à 10 % en poids d'un copolymère comportant au moins une séquence présentant un caractère hydrophile et au moins une séquence présentant un caractère hydrophobe, ladite séquence à caractère hydrophobe comprenant de préférence au moins une unité récurrente répondant à la formule générale (I).

25 Avantageusement, la séquence à caractère hydrophile du copolymère précité est choisie parmi un poly(oxyéthylène), un poly(alcoolvinyle), une poly(vinylpyrrolidone), un poly(N-2-hydroxypropyl méthacrylamide), un poly(hydroxyéthylméthacrylate), un poly(amino acide) hydrophile tel qu'une polylysine, un polysaccharide, et sera de préférence un poly(oxyéthylène).

Le copolymère peut avoir une structure à blocs, de préférence di-blocs ou tri-blocs, ou une structure greffée.

30 L'addition de tels copolymères dans le matériau support permet d'obtenir une dispersion homogène de la substance à encapsuler à l'intérieur de chacune des microsphères.

Elle permet également de moduler le rapport hydrophilie/hydrophobie de la surface des microsphères, ce qui permet d'éviter ou de limiter les interactions fortes et souvent dénaturantes avec la substance à encapsuler.

En outre, ces copolymères, dont la nature chimique de la séquence hydrophobe est identique à celle de l'homopolymère constituant pour l'essentiel les microsphères, sont particulièrement avantageux pour la mise en oeuvre du procédé actuellement préféré de préparation des microsphères comme cela sera expliqué plus en détail par la suite.

D'une façon générale, les microsphères conformes à la présente invention peuvent être obtenues par la mise en oeuvre d'un procédé comportant :

- la préparation d'une émulsion multiple à trois phases, dont la phase intermédiaire est constituée d'une solution du ou des polymères constituant le matériau support dans un solvant organique volatil, et
- l'évaporation dudit solvant organique, dans des conditions permettant de provoquer la précipitation du polymère autour des gouttelettes constituant la phase interne.

Cette émulsion multiple peut être obtenue de façon classique en dispersant une émulsion primaire du type eau-dans-huile dans une seconde phase aqueuse contenant un agent stabilisant.

Cette émulsion multiple peut également être obtenue par un procédé "inverse" consistant à verser une solution aqueuse dans une émulsion primaire de type eau-dans-huile. D'une façon tout à fait inattendue, ce procédé "inverse" a permis d'obtenir des résultats tout à fait remarquables parfois même meilleurs que ceux obtenus par la technique classique précitée.

Ainsi, selon un deuxième aspect, la présente invention concerne un procédé d'obtention de microsphères telles que précédemment décrites, comprenant :

- a) la préparation d'une première solution du ou des polymère(s) précité(s) constituant le matériau support dans un solvant organique volatil contenant éventuellement un agent tensio-actif,
- b) la préparation d'une seconde solution non miscible avec la solution obtenue en a), contenant éventuellement ladite substance à disperser et éventuellement un agent tensio-actif,

- c) la préparation d'une émulsion primaire par dispersion de la seconde solution dans la première solution, la phase continue étant constituée par la solution de polymère(s),
- d) la préparation d'une émulsion secondaire :

5 - soit en dispersant, sous agitation, l'émulsion primaire obtenue en c) dans un milieu dispersant non miscible avec ladite émulsion primaire, ledit milieu dispersant contenant éventuellement un agent stabilisant ;

- soit en versant sous agitation, dans ladite émulsion primaire, une solution constituée d'un milieu non miscible avec ladite émulsion primaire, ledit milieu
10 contenant éventuellement un agent stabilisant,

e) l'évaporation dudit solvant organique sous agitation.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, le procédé précité comprend en outre :

- f) l'isolation des microsphères par centrifugation
- 15 g) un ou plusieurs lavages successifs desdites microsphères
- h) la lyophilisation desdites microsphères.

La première étape du procédé de préparation des microsphères conforme à l'invention comporte donc la réalisation d'une émulsion de type eau-dans-huile de préférence en présence d'un agent tensio-actif approprié, la phase huileuse ou
20 organique contenant le ou les polymères destinés à constituer le matériau support desdites microsphères.

Dans un premier temps, une solution du ou des polymère(s) constituant le matériau support est préparée à l'aide d'un solvant organique volatil approprié éventuellement en présence d'un agent tensio-actif.

25 Avantageusement, on utilisera dans cette étape, des polymères préformés dans la mesure où les homopolymères constituant pour l'essentiel le matériau support des microsphères peuvent être obtenus dans des conditions permettant une bonne caractérisation en terme de masse molaire et de dispersité en masse.

Les homopolymères constitués d'unités récurrentes répondant à la
30 formule générale (I) peuvent être préparés à partir de monomères, par exemple, en suivant le procédé décrit dans le brevet EP 283346 correspondant aux brevets US 4 931 584 et US 5 142 098 incorporés ici par référence, lesdits monomères étant généralement dégazés sous vide de pompe à palettes jusqu'à poids constant pour éliminer l'inhibiteur de polymérisation (SO₂).

Ces homopolymères seront cependant avantageusement préparés par voie anionique en milieu aprotique, par exemple par dispersion du monomère dans l'acétone, suivie de l'ajout de soude sous agitation, encore suivie de l'évaporation de l'acétone et du séchage du polymère ainsi obtenu.

5 D'autres solvants organiques aprotiques tels que l'acétonitrile, le dioxane et le tétrahydrofurane peuvent être utilisés en lieu et place de l'acétone.

La masse moléculaire de l'homopolymère susceptible d'être obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé peut être parfaitement maîtrisée par un choix judicieux des conditions de mise en oeuvre, et en particulier de la concentration en 10 monomère dans la phase organique, du pH et de la molarité de l'amorceur de polymérisation (soude).

D'une façon générale, on utilisera dans le cadre de la présente invention des homopolymères présentant une masse molaire moyenne de 1.000 à 100.000, et de préférence de 5.000 à 80.000.

15 Le solvant organique volatil susceptible d'être utilisé pour la préparation de la première solution contenant le ou les polymères constituant le matériau support sera généralement choisi de telle sorte que son point d'ébullition soit inférieur à celui de l'eau. Ce solvant pourra donc être éliminé facilement lors de l'étape finale d'évaporation en permettant la précipitation du polymère.

20 L'acétate d'éthyle constitue un solvant organique volatil particulièrement approprié à cet effet.

Les tensio-actifs susceptibles d'être utilisés pour la stabilisation de l'émulsion primaire peuvent être de nature variée et seront ajoutés à la phase organique contenant le(s) polymère(s) (première solution) et/ou à la phase aqueuse 25 (seconde solution) constituant la phase dispersée.

Il peut s'agir par exemple d'un poloxamer tel que le produit commercialisé sous la dénomination Pluronic® F68, ou bien encore d'un alcool polyvinyle tel que le produit commercialisé sous la dénomination Mowiol® 40-88, ou bien encore d'un polysorbate, ou bien encore d'un copolymère tensio-actif 30 dont la séquence hydrophobe présente une nature chimique identique à celle de l'homopolymère constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I).

Il a été montré que de tels copolymères tensio-actifs et en particulier les copolymères de poly(méthylidène malonate) et de polyoxyéthylène sont particulièrement avantageux dans la mesure où ils permettent d'une part, d'obtenir

une émulsion primaire très stable et d'autre part, d'obtenir un bon ancrage du tensio-actif dans la matrice après évaporation du solvant.

Les copolymères tensio-actifs précités peuvent être préparés par des techniques de polymérisation classiques bien connues de l'homme de métier.

5 Parmi ces techniques, on utilisera de préférence la polymérisation par voie anionique, la polymérisation par voie radicalaire, ou encore la technique de couplage des séquences précurseurs du copolymère, ces séquences ayant été au préalable fonctionnalisées en bout de chaîne de façon adéquate.

10 La polymérisation par voie anionique convient plus particulièrement à la préparation de copolymères à blocs.

Elle comporte l'addition séquentielle des monomères et permet d'obtenir des copolymères de structure parfaitement définie, les quantités d'amorceurs et de monomères engagés permettant de contrôler le degré de polymérisation de chacune des séquences.

15 Un copolymère à blocs peut être ainsi obtenu :

- soit par polymérisation anionique d'un premier monomère et réaction sur la chaîne en croissance d'un second monomère ;
- soit par activation d'un polymère précurseur qui servira d'amorceur à la polymérisation d'un second monomère.

20 Les agents d'amorçage susceptibles d'être utilisés dans le cadre de ces polymérisations par voie anionique seront généralement :

- d'une part, les dérivés organométalliques comme le butyllithium et en particulier le diphenylhexyllithium ;
- d'autre part, des alcoolates et en particulier les alcoolates macromoléculaires tels qu'un alcoolate de POE qui peuvent être générés par activation d'une fonction hydroxy à l'aide de cumylpotassium, de diphenylméthylpotassium, de naphtalène potassium.

La polymérisation par voie anionique sera généralement réalisée dans un solvant compatible avec les diverses séquences du copolymère.

30 Dans le cas où la séquence à caractère hydrophile est constituée d'un poly(oxyéthylène) et la séquence à caractère hydrophobe est constituée d'un poly(méthylidène malonate), les copolymères à blocs seront préparés de préférence par polymérisation anionique successive de l'oxyde d'éthylène puis du méthylidène malonate ou par activation d'un précurseur polyoxyéthyléné

monohydroxylé commercial et polymérisation anionique subséquente de la séquence poly(méthylidène malonate).

D'une façon générale, on utilisera de préférence le tétrahydrofurane comme solvant de polymérisation, ce produit permettant de travailler en milieu homogène et influençant favorablement la cinétique de polymérisation.

Les monomères utilisés pour la préparation des séquences hydrophiles seront généralement des produits commerciaux.

La technique de couplage convient également plus particulièrement à la préparation de copolymères à blocs.

Cette réaction est généralement réalisée à partir d'homopolymères présynthétisés et fonctionnalisés, en présence d'un agent de couplage et éventuellement d'un agent d'activation, dans un solvant approprié.

Dans le cas de la préparation des copolymères préférés selon l'invention, dont la séquence hydrophile est constituée d'un poly(oxyéthylène) et la séquence hydrophobe est constituée d'un poly(méthylidène malonate), on utilisera avantageusement un homopolymère du poly(oxyéthylène) fonctionnalisé par un groupement α -carboxy et un homopolymère du poly(méthylidène malonate) fonctionnalisé par un groupement α -hydroxy.

L'homopolymère du poly(oxyéthylène) fonctionnalisé par un groupement α -carboxy peut être obtenu par exemple par transformation par l'anhydride succinique d'un poly(oxyéthylène) fonctionnalisé par un groupement α -hydroxy commercial.

L'homopolymère du poly(méthylidène malonate) fonctionnalisé par un groupement α -hydroxy peut être obtenu directement par synthèse anionique en milieu aqueux ou par synthèse anionique dans un solvant en utilisant une solution aqueuse de soude comme amorceur de la polymérisation.

En tant qu'agent de couplage particulièrement adapté à cette polymérisation, on utilisera avantageusement le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI).

La réaction de couplage peut être éventuellement activée par catalyse basique et se déroulera généralement dans un solvant compatible avec les homopolymères, comme en particulier le dichlorométhane dans le cas particulier des copolymères préférés de l'invention.

La polymérisation par voie radicalaire convient plus particulièrement à la préparation de copolymères greffés.

Cette polymérisation est généralement réalisée à partir d'un macromonomère, c'est à dire d'un oligomère portant à l'une de ses extrémités un groupement éthylénique polymérisable par voie radicalaire et susceptible de réagir avec un monomère pour former un copolymère à structure greffée.

Cette polymérisation sera généralement réalisée en présence d'un amorceur dans un solvant approprié.

Dans le cas de la préparation des copolymères dont la séquence hydrophile est constituée d'un poly(oxyéthylène) divers macromomères fonctionnalisés pourront être utilisés.

On préférera plus particulièrement utiliser un macromonomère de poly(oxyéthylène) fonctionnalisé par un groupement méthacryloyle.

Un tel produit peut être commercial (Aldrich) et sera constitué par exemple d'une chaîne de poly(oxyéthylène) de masse molaire comprise entre 308 et 440 g/mol, ou sera préparé à partir d'un poly(éthylèneglycol)monométhyléther commercial par couplage avec l'acide méthacrylique dans le dichlorométhane pour former une fonction terminale méthoxy.

On peut encore préparer un tel macromonomère par activation d'un poly(oxyéthylène) et réaction subséquente sur le chlorure de méthacryloyle.

Les copolymères à structures greffées peuvent également être préparés par transestérification d'un poly(oxyéthylène) monométhyléther sur des chaînes latérales esters d'un poly(méthylidène malonate) pré-synthétisé.

Cette transestérification sera généralement réalisée avec de l'alcool en présence d'un catalyseur à température élevée.

Des copolymères dont la masse molaire totale des séquences à caractère hydrophobe est comprise entre 1.000 et 80.000 g/mol, et de préférence entre 1.000 et 50.000 g/mol conviennent particulièrement dans le cadre de la présente invention.

D'une façon générale, l'émulsion primaire servant à la préparation des microsphères selon l'invention pourra être obtenue au moyen d'un homogénéisateur cisaillant par exemple de type Ultraturrax (13.500 tr/mn - 5 mn).

La substance à encapsuler est généralement additionnée à la phase aqueuse dispersée de l'émulsion primaire.

La deuxième étape du procédé de préparation des microsphères conformes à l'invention comprend la préparation d'une émulsion secondaire :

- soit en dispersant, sous agitation, l'éulsion primaire obtenue à la première étape dans un milieu dispersant non miscible avec ladite éulsion primaire, ledit milieu

5 dispersant contenant éventuellement un agent stabilisant ;

- soit en versant sous agitation dans ladite éulsion primaire, une solution constituée d'un milieu non miscible avec ladite éulsion primaire, ledit milieu contenant éventuellement un agent stabilisant.

Généralement, le milieu dispersant non miscible avec l'éulsion primaire
10 est une phase aqueuse dans laquelle l'éulsion primaire est introduite de préférence goutte à goutte et l'éulsion est également réalisée par exemple à l'aide d'un homogénéisateur du type Ultraturrax (8.000 tr/mn ; 5mn).

L'alcool polyvinyle constitue un agent stabilisant particulièrement approprié pour la préparation de l'éulsion secondaire.

15 Eventuellement, cette deuxième étape peut être suivie d'une étape supplémentaire de déplacement du solvant organique.

La troisième étape essentielle du procédé de préparation des microsphères conformes à l'invention, consiste à évaporer le solvant organique volatil ayant servi à la préparation de la solution du ou des polymères.

20 Dans le cas particulier où ce solvant est l'acétate d'éthyle, cette évaporation s'effectue pendant une durée d'environ 12 heures à température ambiante, sous agitation mécanique (1.400 tr/mn).

25 L'homme de métier choisira de façon appropriée les différentes conditions de mise en oeuvre de ces trois premières étapes essentielles du procédé conforme à la présente invention en fonction des caractéristiques physico-chimiques et morphologiques des microsphères recherchées.

D'une façon générale, ces microsphères présenteront un diamètre moyen compris entre 1 µm et 100 µm, de préférence entre 5 µm et 50 µm pour leur application en tant que vecteurs dans le domaine pharmaceutique.

30 D'une façon générale, les microsphères obtenues à l'issue de la troisième étape seront isolées par centrifugation, lavées et éventuellement lyophilisées.

Selon un troisième aspect, la présente invention concerne également des compositions pharmaceutiques contenant les microsphères qui viennent d'être décrites. Ces compositions seront généralement appropriées pour une

administration par voie orale et se présenteront par exemple sous la forme de comprimés, de gélules, de poudres ou de granules.

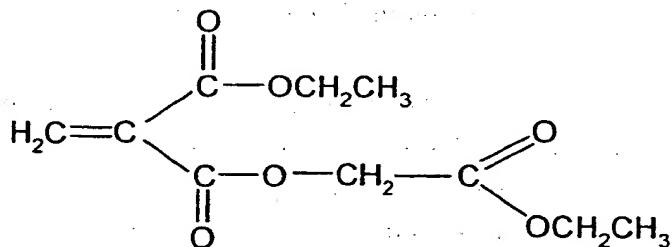
La présente invention va maintenant être illustrée par les exemples non limitatifs suivants :

5 Dans ces exemples, les abréviations suivantes ont été utilisées :

OE : oxyde d'éthylène

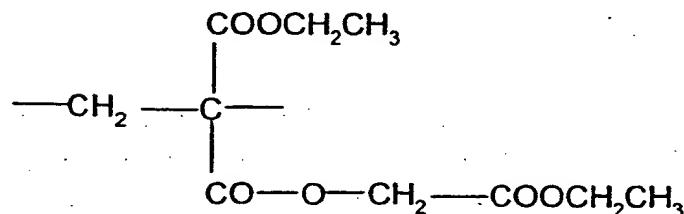
10 **POE** : poly(oxyéthylène)

MM 2.1.2 : méthylidène malonate répondant à la formule :



15 encore dénommé : 1-éthoxycarbonyl-1-éthoxycarbonylméthylène-oxycarbonyléthène

PMM 2.1.2 : polymère constitué d'unités monomères récurrentes répondant à la formule



Par ailleurs, dans ces exemples :

- la taille des microsphères a été mesurée par la technique du compteur Coulter et l'examen morphologique réalisé en microscopie électronique à balayage, soit sur les microsphères brutes de fabrication, soit après cryofracture ;

- la masse moléculaire des polymères a été déterminée par chromatographie de perméation de gel (CPG).

EXEMPLE 1

5

100 mg de méthylidène malonate 2.1.2 sont dissous dans 10 ml d'acétone sous agitation magnétique. 100 microlitres de soude 0,1 N sont ajoutés progressivement sous agitation magnétique. La polymérisation est maintenue pendant 5 minutes puis 100 microlitres d'HC1 0,1 N sont ajoutés toujours sous 10 agitation magnétique. L'acétone est entièrement évaporé sous vide. Le polymère obtenu est ensuite lavé à l'aide d'environ 100 ml d'eau distillée puis séché sous vide. La masse moléculaire de ce polymère est de 30.000.

15 280 mg de polyméthylidène malonate sont dissous dans 10 ml d'acétate d'éthyle. 1 ml de phase aqueuse contenant 60 mg d'ovalbumine est émulsionné dans la phase organique sous agitation à l'aide d'un Ultraturrax à une vitesse de 13.500 rpm pendant 5 minutes. Cette émulsion est ensuite ajoutée à 100 ml d'une solution aqueuse d'alcool polyvinyle à 2 %, l'agitation étant réalisée à l'aide 20 d'un Ultraturrax à une vitesse de 8.000 rpm pendant 5 minutes. L'évaporation de l'acétate d'éthyle est réalisée à température ambiante pendant la nuit, sous agitation mécanique (pale tournante) à une vitesse de 1.400 rpm. Les microsphères sont recueillies après centrifugation à 4.000 rpm pendant 10 minutes puis lavées 6 fois avec de l'eau distillée et chaque fois soumises à une nouvelle centrifugation. Après 25 la dernière centrifugation, les microsphères sont remises en suspension dans un volume de 3 ml d'eau distillée puis lyophilisées.

30 Les microsphères ainsi obtenues ont un diamètre moyen de 6 microns et 14,2 % de l'ovalbumine mise en oeuvre dans la préparation sont encapsulés dans les microsphères de PMM 2.1.2, ce qui correspond à une encapsulation de 2,5 % (w/w).

Cette préparation est administrée par voie orale à des souris C3H à la dose de 100 microgrammes d'ovalbumine encapsulée (par souris et par jour) pendant 5 jours consécutifs. Le dernier gavage a lieu 7 jours avant la

sensibilisation des animaux à l'ovalbumine qui est effectuée par injection sous-cutanée d'ovalbumine libre (100 microgrammes par souris) aux jours J0 et J14. 90 % des souris survivent à la deuxième injection d'ovalbumine alors que moins de 30 % des souris gavées par les microsphères sans ovalbumine ou par la même dose d'ovalbumine non encapsulée survivent.

EXEMPLE 2

On procède suivant l'exemple 1 mais du Pluronic F 68 est ajouté dans la phase aqueuse contenant l'ovalbumine à la concentration de 2 %.

EXEMPLE 3

On procède suivant l'exemple 1 mais 20 mg de copolymère de POE-PMM sont ajoutés dans la phase organique contenant le polymère.

Dans cet exemple, un copolymère à blocs POE-PMM 2.1.2 a été utilisé. Ce copolymère a été obtenu par polymérisation successive des deux monomères en commençant par la préparation du bloc POE, par la mise en oeuvre du protocole expérimental suivant.

Le réacteur dans lequel est effectué la polymérisation (250 ml) est raccordé à une rampe à vide permettant de travailler sous vide poussé et de s'affranchir des impuretés protiques.

Le solvant (THF, 150 ml) purifié de toute trace d'humidité est cryodistillé dans le réacteur à - 70°C.

L'amorceur (Terbutanolate de potassium (0.1N/THF) ; 10 ml) est ensuite ajouté à l'aide d'une seringue au travers d'un septum.

L'oxyde d'éthylène (5 g) est alors introduit par cryodistillation.

La polymérisation s'effectue à température ambiante pendant 48 heures. Après cette durée, un prélèvement permet de contrôler, par chromatographie par perméation de gel, la masse molaire (4.000 g/mol) et l'indice de polymolécularité (1.13) de la première séquence.

Le MM 2.1.2 (0,5 ml) fraîchement dégazé sous vide pour enlever le SO₂, utilisé comme inhibiteur de polymérisation, est alors rajouté rapidement et en une seule fois à température ambiante.

Après 5 heures, le copolymère est désactivé par ajout de méthanol et précipité dans l'éther diéthylique.

5 motifs dérivés de MM 2.1.2 sont fixés au POE, ce qui correspond à une masse molaire pour le PMM 2.1.2 de 1.150 g/mol.

5 L'analyse thermique du copolymère révèle une température de transition vitreuse de - 16°C ainsi qu'un pic de fusion de 45°C ($\Delta H = 117 \text{ J/g}$).

EXAMPLE 4

10 On procède suivant la technique décrite dans l'exemple 1, mais l'ovalbumine (60 mg) est remplacée par 2 mg du peptide V3 28 de la boucle V3 BRU de la gp 120 du VIH (séquence NNTRKSIHI GPGRAFYATGDIIGDIRQA). Les microsphères obtenues ont une taille moyenne de 5.8 microns et 70 % du peptide V3 28 mis en oeuvre sont encapsulés dans les microsphères ce qui 15 correspond à une encapsulation de 0.48 % w/w. L'étude réalisée en microscopie électronique à balayage révèle des particules lisses et de forme sphérique.

EXAMPLE 5

20 On procède suivant l'exemple 4 mais du Pluronic F 68 est ajouté dans la phase aqueuse contenant le peptide à la concentration de 2 %. Les microsphères obtenues ont une taille de 7.0 microns et 70 % du peptide V3 28 mis en oeuvre sont encapsulés dans les microsphères.

25 EXAMPLE 6

On procède suivant l'exemple 4 mais 20 mg de copolymère de POE-PMM sont ajoutés dans la phase aqueuse contenant le peptide.

30

EXEMPLE 7

On procède suivant l'exemple 4 mais 20 mg de copolymère de POE-PMM sont ajoutés dans la phase organique contenant le polymère.

5

EXEMPLE 8

On procède suivant l'exemple 1 mais la phase aqueuse interne est constituée de 1 ml d'acide acétique 0,5M contenant 3 mg de collagène de type II.
10 Les microsphères ainsi obtenues ont un diamètre moyen de 6 microns et 66.6 % du collagène mis en oeuvre dans la préparation sont encapsulés dans les microsphères de PMM2.1.2, ce qui correspond à une encapsulation de 0.7 % (w/w).

15

EXEMPLE 9

On procède suivant l'exemple 1 mais la phase aqueuse interne est constituée de 1 ml d'eau distillée. Les microsphères ainsi obtenues ne contiennent pas de substance biologiquement active. Leur diamètre moyen est de 7.0 microns.

20

EXEMPLE 10

On procède suivant la technique décrite dans l'exemple 1 mais l'ovalbumine (60 mg) est remplacée par le plasmide pCDNA3 (5 mg).
25 Les microsphères obtenues ont une taille moyenne de 7 µm et 9,8 % de plasmide mis en oeuvre sont encapsulés dans les microsphères ce qui correspond à une encapsulation de 0,17 % (w/w).

L'étude réalisée en microscopie électronique à balayage révèle des particules lisses et de forme sphérique.

30

EXEMPLE 11

On procède suivant l'exemple 10 mais du Pluronic® est ajouté dans la phase aqueuse contenant le plasmide, à la concentration de 2 %.

Les microsphères ainsi obtenues ont un diamètre moyen de 7 µm et 12 % du plasmide mis en oeuvre sont encapsulés dans les microsphères ce qui correspond à une encapsulation de 0,22 % (w/w).

5

EXAMPLE 12

On procède suivant la technique décrite dans l'exemple 1 mais l'ovalbumine (60 mg) est remplacée par l'oligonucléotide (pdT16) (2 mg).

10 Les microsphères obtenues ont une taille moyenne de 4,8 µm et 20,6 % d'oligonucléotide mis en oeuvre sont encapsulés dans les microsphères ce qui correspond à une encapsulation de 0,19 % (w/w).

EXAMPLE 13

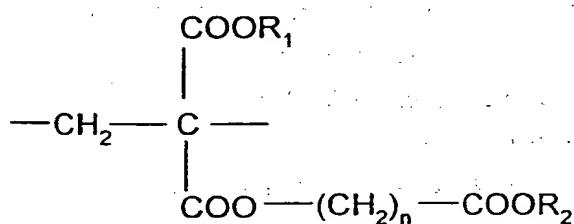
15

On procède suivant l'exemple 12 mais du Pluronic® à la concentration de 2 % est ajouté dans la phase aqueuse contenant l'oligonucléotide.

20 Les microsphères obtenues ont un diamètre moyen de 5,7 µm et 23 % d'oligonucléotide mis en oeuvre sont encapsulés dans les microsphères ce qui correspond à une encapsulation de 0,21 % (w/w).

REVENDICATIONS

1. Microsphères constituées d'un réseau continu d'un matériau support dans lequel est éventuellement dispersée une substance, caractérisées en ce que ledit matériau support contient au moins 70 % en poids d'un homopolymère constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I) suivante :



10 dans laquelle :

- R₁ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ou un groupe (CH₂)_m - COOR₃, dans lequel m est un nombre entier compris entre 1 et 5 et R₃ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ;
- R₂ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et
- n est un nombre entier compris entre 1 et 5.

15 2. Microsphères selon la revendication 1, caractérisées en ce que l'homopolymère précité est constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I) dans laquelle :

R₁ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ;

20 R₂ représente un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et n est un nombre égal à 1.

3. Microsphères selon la revendication 1, caractérisées en ce que l'homopolymère précité est constitué d'unités récurrentes répondant à la formule générale (I) dans laquelle R₁ et R₂ représentent un groupement CH₂-CH₃.

25 4. Microsphères selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que ledit matériau support contient :

- de 90 % à 99,5 % en poids d'un homopolymère tel que défini à la revendication 1, 2 ou 3 ; et
- de 0,5 % à 10 % en poids d'un copolymère comportant au moins une séquence présentant un caractère hydrophile et au moins une séquence présentant un

caractère hydrophobe, ladite séquence à caractère hydrophobe comprenant au moins une unité récurrente répondant à la formule générale (I).

5. Microsphères selon la revendication 4, caractérisées en ce que la séquence à caractère hydrophile dudit copolymère précité est choisie parmi un poly(oxyéthylène), un poly(alcoolvinylique), une poly(vinylpyrrolidone), un poly(N-2 hydroxypropyl méthacrylamide), un poly(hydroxyéthylméthacrylate), un poly(amino acide) hydrophile tel qu'une polylysine, un polysaccharide.

6. Microsphères selon la revendication 4 ou 5, caractérisées en ce que ledit copolymère a une structure à blocs, de préférence di-blocs ou tri-blocs, ou une 10 structure greffée.

7. Microsphères selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce qu'une substance est effectivement dispersée dans ledit matériau support, ladite substance étant éventuellement biologiquement active.

8. Microsphères selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, 15 caractérisées en ce que ladite substance dispersée est un peptide.

9. Microsphères selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisées en ce que ladite substance dispersée est une protéine.

10. Procédé de préparation de microsphères selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 a) la préparation d'une première solution du ou des polymère(s) précité(s) constituant le matériau support dans un solvant organique volatil contenant éventuellement un agent tensio-actif,

b) la préparation d'une seconde solution non miscible avec la solution obtenue en a), contenant éventuellement ladite substance à disperser et 25 éventuellement un agent tensio-actif,

c) la préparation d'une émulsion primaire par dispersion de la seconde solution dans la première solution, la phase continue étant constituée par la solution de polymère(s),

d) la préparation d'une émulsion secondaire :

30 - soit en dispersant, sous agitation, l'émulsion primaire obtenue en c) dans un milieu dispersant non miscible avec ladite émulsion primaire, ledit milieu dispersant contenant éventuellement un agent stabilisant ;

- soit en versant sous agitation, dans ladite émulsion primaire, une solution constituée d'un milieu non miscible avec ladite émulsion primaire, ledit milieu contenant éventuellement un agent stabilisant,
- e) l'évaporation dudit solvant organique sous agitation.

5 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape e') de déplacement dudit solvant organique, ladite étape e') étant mise en oeuvre entre l'étape d) et l'étape e).

12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

- 10 f) l'isolation des microsphères par centrifugation
- g) un ou plusieurs lavages successifs desdites microsphères
- h) la lyophilisation desdites microsphères.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que l'agent tensio-actif utilisé pour la préparation de l'émulsion primaire est choisi parmi les poloxamers, les polysorbates, les alcools polyvinyliques et les copolymères tels que définis dans l'une quelconque des revendications 4 à 6.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que ledit agent stabilisant utilisé pour la préparation de l'émulsion secondaire est un alcool polyvinyle

20 15. Compositions pharmaceutiques destinées à une administration par voie orale, caractérisées en ce qu'elles contiennent des microsphères telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou obtenues par la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int.	National Application No
PCT/FR 99/01005	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C08F C08G A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	FR 2 755 136 A (VIRSOL) 30 April 1998 (1998-04-30) the whole document ---	1-3
X	WO 96 25954 A (SCHERING AG ; ALBAYRAK CELAL (DE); ROESSLING GEORG (DE)) 29 August 1996 (1996-08-29) page 3 ---	1-3, 7 ..
A	EP 0 583 955 A (JAPAN RES DEV CORP) 23 February 1994 (1994-02-23) ---	4-6, 8-15
A	EP 0 583 955 A (JAPAN RES DEV CORP) 23 February 1994 (1994-02-23) ---	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 1999

Date of mailing of the international search report

30/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Friederich, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01005

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LESCURE F ET AL: "PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL POLY(METHYLIDENE MALONATE 2.1.2.)-MADE NANOPARTICLES" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 11, no. 9, 1 September 1994 (1994-09-01), pages 1270-1277, XP000574092 page 1270 - page 1277	1-3, 7-9
A		10-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte ~~l~~ ~~lational Application No~~

PCT/FR 99/01005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2755136	A 30-04-1998	AU 4950997	A 22-05-1998	A 22-05-1998
		WO 9818455	A 07-05-1998	A 07-05-1998
WO 9625954	A 29-08-1996	DE 19508049	A 12-09-1996	A 12-09-1996
		CA 2213615	A 29-08-1996	A 29-08-1996
		EP 0804250	A 05-11-1997	A 05-11-1997
		JP 11500435	T 12-01-1999	T 12-01-1999
EP 0583955	A 23-02-1994	JP 2777530	B 16-07-1998	B 16-07-1998
		JP 6107565	A 19-04-1994	A 19-04-1994
		AU 668967	B 23-05-1996	B 23-05-1996
		AU 4452393	A 10-03-1994	A 10-03-1994
		CA 2104045	A,C 15-02-1994	A,C 15-02-1994
		KR 9609407	B 19-07-1996	B 19-07-1996
		US 5449513	A 12-09-1995	A 12-09-1995
		US 5510103	A 23-04-1994	A 23-04-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : de Internationale No

PCT/FR 99/01005

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K9/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C08F C08G A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	FR 2 755 136 A (VIRSOL) 30 avril 1998 (1998-04-30) le document en entier ---	1-3
X	WO 96 25954 A (SCHERING AG ; ALBAYRAK CELAL (DE); ROESSLING GEORG (DE)) 29 août 1996 (1996-08-29) page 3 ---	1-3, 7
A	EP 0 583 955 A (JAPAN RES DEV CORP) 23 février 1994 (1994-02-23) ---	4-6, 8-15
A	EP 0 583 955 A (JAPAN RES DEV CORP) 23 février 1994 (1994-02-23) ---	1-15
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 juillet 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Friederich, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. IDE Internationale No
PCT/FR 99/01005

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LESCURE F ET AL: "PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL POLY(METHYLIDENE MALONATE 2.1.2.)-MADE NANOPARTICLES" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 11, no. 9, 1 septembre 1994 (1994-09-01), pages 1270-1277, XP000574092 page 1270 - page 1277	1-3, 7-9
A		10-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 99/01005

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2755136 A	30-04-1998	AU 4950997 A WO 9818455 A	22-05-1998 07-05-1998
WO 9625954 A	29-08-1996	DE 19508049 A CA 2213615 A EP 0804250 A JP 11500435 T	12-09-1996 29-08-1996 05-11-1997 12-01-1999
EP 0583955 A	23-02-1994	JP 2777530 B JP 6107565 A AU 668967 B AU 4452393 A CA 2104045 A,C KR 9609407 B US 5449513 A US 5510103 A	16-07-1998 19-04-1994 23-05-1996 10-03-1994 15-02-1994 19-07-1996 12-09-1995 23-04-1994